重组大肠杆菌转化甘油合成聚 3-羟基丙酸-co-乳酸*

赵志强 [1,2**]，Stephen T Lacmata[1,3**]，咸漠 [1]，刘修涛 [1,2]，冯新军 [1***]，赵广 [1***]

（1 中国科学院青岛生物能源与过程研究所 生物基材料重点实验室 青岛 266101）

（2 中国科学院大学 北京 100049）

（3 喀麦隆德尚大学 德尚 999108）

摘要 聚羟基脂肪酸酯作为性质优良的生物塑料，引起了广泛的关注。由于聚羟基脂肪酸合成酶 PhaC 特异性较强，难以通过生物合成方法获得含乳酸单体聚合物。为了实现乳酸的聚合，PhaC 的筛选至关重要。以甘油为底物，通过引入 *Klebsiella pneumoniae* 的甘油脱水酶 DhaB123 及其激活因子 GdrAB 以及 *Salmonella typhimurium* LT2 的丙醛脱氢酶基因 PduP，获得 3-羟基丙酰辅酶 A；通过引入 *Megasphaera elsdenii* DSM 20460 的丙酰辅酶 A 转移酶 PCT，获得乳酰辅酶 A；并对 3 种不同聚羟基脂肪酸合成酶的作用进行考察。在 *Pseudomonas putida* 的原始酶 PhaC1 或者 PhaC2 的作用下，不能实现乳酸的聚合；而在双位点突变（Ser325Thr 和 Gln481Lys）的 PhaC1（STQK）存在条件下，重组菌可以利用甘油合成聚 3-羟基丙酸-co-乳酸。经过对溶氧、有机氮源等发酵条件的优化，聚 3-羟基丙酸-co-乳酸的产量可以达到 0.22g/L，占细胞干重的 3.2%，是含乳酸单体聚合物生物合成研究的一次有益尝试。

关键词 聚 3-羟基丙酸-co-乳酸；聚羟基脂肪酸合成酶；丙酰辅酶 A 转移酶；位点突变；甘油

中图分类号 Q819

聚羟基脂肪酸酯（polyhydroxyalkanoates，PHAs)是微生物细胞在环境中碳源过剩的条件下合成的一种线性聚酯，由羟基脂肪酸（hydroxyalkanoic acid，HA）单体聚合而成，作为碳源和能源的贮藏物质在细胞内积累[1-2]。PHAs 不仅具有石化基塑料的各种属性，还具备传统塑料无法比拟的生物相容性和生物降解性，引起了科技界和工业界的广泛关注，已经被用于化妆品、医疗器械、药物载体等领

收稿日期： 修回日期：

* 国家自然科学基金（(31670089）、中国科学院重点部署项目（ZDRW-ZS-2016-3M）资助项目

** 共同第一作者

*** 通讯作者，电子邮箱：fengxj@qibebt.ac.cn; zhaoguang@qibebt.ac.cn

域[3-5]。能够合成 PHAs 的微生物有几十个属，包括产碱杆菌属（*Alcaligenes*）、芽孢杆菌属（*Bacillus*）、假单胞菌属（*Pseudomonas*）和红螺菌属（*Rhodospirillum*）等[6-10]，此外，一些植物也能够合成 PHAs[11-12]。

由于聚羟基脂肪酸合成酶 PhaC 的特异性较强，已经实现全生物法合成的 PHAs 主要是以 3-羟基酸为单体，如聚 3-羟基丙酸（P3HP）[13]、聚 3-羟基丁酸（P3HB）[14]、聚 3-羟基戊酸（P3HV）[15]等。聚乳酸作为一种优异的生物塑料，已经被广泛用于生物医学、纺织、包装等领域[16]，市场需求呈逐年增大趋势，预计每 3～4 年增长一倍[17]。然而，较之 3-羟基酸，乳酸（2-羟基丙酸）的羟基位置变化，导致难以实现生物法聚合。市场上的聚乳酸（PLA）产品都是以乳酸为单体，通过化学法聚合得到。随着市场需求的逐渐扩大，以葡萄糖、甘油等廉价碳源为原料，实现全生物法合成聚乳酸，对于进一步降低生产成本、提高产品效益具有重要意义。

生物法合成聚乳酸的关键因素在于 PhaC 的筛选。为了实现乳酸的聚合，本研究在前期P3HP 研究的基础上，通过引入丙酰辅酶 A 转移酶 PCT 和不同的 PhaC，期望实现新型生物塑料聚 3-羟基丙酸-co-乳酸（P(3HP-co-LA)）的生物合成（图 1）。整个代谢途径涉及两个支路，其中一个支路利用甘油脱水酶 DhaB123 和丙醛脱氢酶 PduP 将甘油转化为 3-羟基丙酰辅酶 A，另外一个支路利用丙酰辅酶 A 转移酶 PCT 催化乳酸为乳酰辅酶 A，两个支路获得的单体最终在 PhaC 的作用下聚合。已有研究表明，第 325 和 481 两个氨基酸位点是与 PhaC 的酶活和底物选择性最密切相关的两个位点[18]。所以，本研究将重点考察假单胞菌 *Pseudomonas putida* 的 PhaC1、PhaC2 和双位点突变（Ser325Thr 和 Gln481Lys）酶 PhaC1(STQK) 的作用效果，并通过发酵条件的初步优化来提高产物产量。

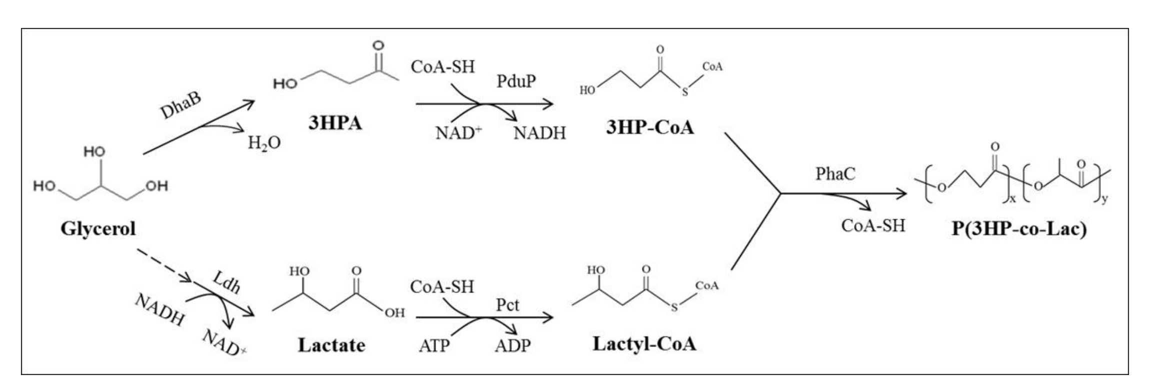


图 1 以甘油为碳源合成 P(3HP-co-LA)的代谢途径示意图

Fig. 1 Biosynthesis pathway of P(3HP-co-LA) from glycerol in this study

1 材料和方法

1.1 菌株、载体和引物

本研究使用到的菌株、载体和引物见表 1。甘油脱水酶基因 *dhaB*123 及其激活因子 *gdrAB* 的来源菌株 *Klebsiella pneumoniae* ATCC25955 购自美国模式培养物集存库(American type culture collection, ATCC)，丙醛脱氢酶基因 *pduP* 的来源菌株 *Salmonella typhimurium* LT2 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心(China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC)，PHA 合成酶基因 *phaC*1 和 *phaC*2 的来源菌 *Pseudomonas putida* 为本实验室保存菌株，携带 PhaC1(STQK)的载体 pTV118N-pp 由北海道大学 Seiichi Taguchi 教授馈赠，携带丙酰辅酶 A 转移酶基因 *pct* 的质粒和各个引物均委托金唯智公司合成获得。

表 1 本研究使用的菌株、载体和引物及其特征描述

Table 1 Strains, vectors and primers used in this study

菌株、质粒及引物	特征描述/引物序列	来源/酶切位点
E. coli DH5α	用于重组质粒的构建和保存的菌株	全氏金公司
E. coli JM109(DE3)	蛋白表达和发酵的宿主菌株	Takara
K. pneumoniae ATCC25955	肺炎克雷伯氏菌，携带甘油脱水酶基因 *dhaB123* 和甘油脱水酶激活因子 *gdrAB*	ATCC
S. typhimurium LT2	鼠伤寒沙门氏菌，携带丙醛脱氢酶基因 *pduP*	CGMCC
Pseudomonas putida	恶臭假单胞菌，携带 PHA 合成酶基因 *phaC*1 和 *phaC*2	本实验室保藏
puC57-*pct*	携带 *Megasphaera elsdenii* DSM 20460 来源的丙酰辅酶 A 转移酶基因 *pct*	金唯智合成
pACYCDuet-f0	重组表达载体，T7 启动子，pACYCDuet-1 携带 *dhaB123*、*gdrAB* 和 *pduP* 基因，氯霉素抗性	本研究构建
pET21a-f1	重组表达载体，T7 启动子，pET21a 携带 *phaC*1 和 *pct* 基因，氨苄抗性	本研究构建
pET21a-f2	重组表达载体，T7 启动子，pET21a 携带 *phaC*2 和 *pct* 基因，氨苄抗性	本研究构建
pTV118N-pp	重组表达载体，lac 启动子，pTV118N 携带 *phac*(STQK)和 *pct* 基因，氨苄抗性	北海道大学
dhaB123-F	CGCCATATGAAAAGATCAAAACGATTTG	*Nde*I
dhaB123-R	CACGGTACCGCTTAGCTTCCTTTACGCAG	*Kpn*I
gdrA-F	GAGAATTCGTGAGCGGAGGTCAGCATGC	*EcoR*I
gdrA-R	TTAGATCTCCCACTGACCAAAGCTG	
gdrB-F	CAGCTTTGGTCAGTGGGAGATCTAAAACGAGGGGACCGTC	
gdrB-R	CAGAAGCTTCAGTTTCTCTCACTTAACG	*Hind*III
pduP-F	CTGAAGCTTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCGCCATCGCGGCTATTAAC	*Hind*III
pduP-R	CAGAAGCTTAGCGAATAGAAAAGCCGTTG	*Hind*III

phaC-1-F	GGAATTCCATATGATGAGTAACAAGAACAACGATGAGC	*Nde*I
phaC-1-R	CGGGATCCTCAACGCTCGTGAACGTAGGTG	*BamH*I
phaC-2-F	GGAATTCCATATGATGACAGACAAACCGGCCAAAGGATC	*Nde*I
phaC-2-R	CGGGATCCTCATCGGGTCAGCACGTAGGT	*BamH*I

1.2 试剂

DNA 聚合酶、DNA Maker 和 T4 DNA 连接酶购自北京全式金生物公司，各种限制性内切酶购自 Fermentas 公司，细菌基因组提取试剂盒和质粒提取试剂盒购自 Omega Bio-tek 公司，氨苄青霉素、氯霉素和异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷（IPTG）购自生工生物，酵母粉、胰蛋白胨购自 Oxoid 公司，牛肉浸粉购自青岛海博生物，大豆蛋白胨、氯仿、无水乙醇和各种无机盐购自国药集团。

1.3 重组菌的构建

本研究使用的重组载体示意图如 2 所示，其中 pACYCDuet-f0、pET21a-f1 和 pET21a-f2 为本研究构建，pTV118N-pp 由北海道大学馈赠。

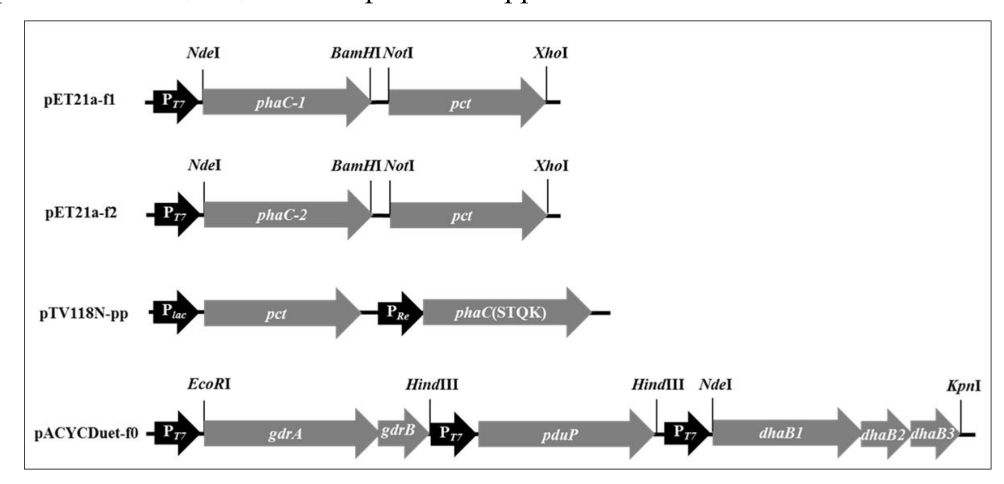


图 2 本研究使用重组载体示意图

Fig.2 The backbones of plasmids used in this study

重组载体 pACYCDuet-f0 的构建：根据 GeneBank 中 *K. pneumoniae* 甘油脱水酶基因 *dhaB*123 和甘油脱水酶激活因子 *gdrAB* 的基因序列、*S. typhimurium* LT2 丙醛脱氢酶基因 *pduP* 的基因序列设计引物（表 1），利用试剂盒提取细菌基因组，以基因组为模板，通过 PCR 扩增分别获得 *dhaB*123、*gdrA*、*gdrB* 和 *pduP* 基因片段，*gdrAB* 则是以 *gdrA* 和 *gdrB* 为底物通过 Overlap PCR 获得。将提取的质粒 pACYCDuet-1 和纯化回收的 *gdrAB* 基因片段在 37℃下双酶切（*EcoR*I/*Hind*III）后切胶回收，利用 T4DNA 连接酶在 16℃过夜连接，连接产物热激转化 *E. coli* DH5α感受态细胞，通过菌落 PCR 验证重组载体 pACYCDuet-*gdrAB*。利用相同

的方法，提取获得 pACYCDuet-*gdrAB* 和 *dhaB*123 片段并进行双酶切（*Nde*I/*Kpn*I），连接转化，获得 pACYCDuet-*gdrAB*-*dhaB*123。在 pACYCDuet-*gdrAB*-*dhaB*123 基础上，与 *Hind*III 位点处插入 *pduP* 片段获得 pACYCDuet-*dhaB*123-*gdrAB*-*pduP*，即 pACYCDuet-f0。

pET21a-f1 和 pET21a-f2 的构建：菌体活化后，分别提取质粒 puC57-*pct* 和 pET21a 并进行双酶切（*Not*I/*Xho*I），切胶回收获得 *pct* 基因片段和 pET21a 载体片段，将载体片段和基因片段酶连后转化 *E. coli* DH5α感受态细胞，通过菌落 PCR 验证重组载体 pET21a-*pct*。根据 GeneBank 中 *Pseudomonas putida* 的 PHA 合成酶基因 *phaC*1 和 *phaC*2 的基因序列设计引物，以 *P. putida* 基因组为模板扩增获得 *phaC*1 和 *phaC*2。利用 *Nde*I 和 *BamH*I 对 *phaC*1、*phaC*2 及重组载体 pET21a-*pct* 进行双酶切，分别进行酶连后转化获得 pET21a-f1 和 pET21a-f2。

重组菌构建：提取所获得的重组载体，将 pET21a-f1、pET21a-f2、pTV118N-pp 与 pACYCDuet-f0 分别组合并转化 *E. coli* JM109(DE3)感受态细胞，涂布含有氯霉素和氨苄青霉素的 LB 固体平板获得重组菌 *E. coli* JM109 (pACYCDuet-f0, pET21a-f1)、*E. coli* JM109 (pACYCDuet-f0, pET21a-f2) 和 *E. coli* JM109 (pACYCDuet-f0, pTV118N-pp)。

1.4 培养基及培养条件

LB 培养基（g/L）：氯化钠，10；胰蛋白胨，10；酵母粉 5；固体培养基加入 10g/L 的琼脂。甘油发酵培养基（g/L）：甘油，20；$(NH_4)_2SO_4$，3；KH_2PO_4，1.5；KCl，1.9；一水合柠檬酸，1；二水合柠檬酸三钠，1.1；$FeSO_4 \cdot 7H_2O$，0.138；微量元素 1 mL；微量元素组成（g/L）：$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$，0.37；$H_3BO_4$，2.47；$MnCl_2 \cdot 4H_2O$，1.58；$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$，0.29；$CuSO_4 \cdot 5H_2O$，0.25。氯霉素贮存液浓度 50mg/mL，工作浓度 50μg/mL；氨苄青霉素贮存浓度 100mg/mL，工作浓度 100μg/mL。发酵培养基最终 pH 用氨水调节至 7。

培养条件：从 LB 平板上挑取单克隆接入含有 3mL LB 液体培养基的试管中，37℃、180 r/min 培养 10h 进行活化。将活化后的菌液按 1%（V/V）的接种量接种于含有 100 mL 发酵培养基的 500 mL 三角摇瓶中，于 37℃ 200r/min 进行培养。菌体浓度 OD_{600} 达到 0.6~0.8 左右时，加入 0.05mM 的 IPTG 进行诱导。诱导后培养温度调节至 30℃继续培养，每隔 12 小时通过补加氨水维持发酵液 pH 在 7 左右，发酵 48h 结束。

1.5 检测方法

菌体浓度通过测定 600 nm 下的紫外吸光度表示。发酵结束后通过高速离心（10000 r/min，10min）收获菌体，利用蒸馏水和无水乙醇清洗两次，并置于 60℃烘箱内 10h 完全烘干，利用天平称量获得细胞干重。烘干的菌体经过碾磨粉碎后，加入氯仿溶液，利用索氏提取器，在 80℃条件下加热 10 h 提取产物，往萃取溶液中加入预冷的无水乙醇使产物沉淀[19]。产物烘干后，通过核磁共振（Advanced III 600 NMR，Bruker）检测物质结构[20]。

2 结果和讨论

2.1 重组菌的构建

通过 PCR 克隆 *K. pneumoniae* 的甘油脱水酶激活因子 *gdrA* 和 *gdrB*，纯化回收后，通过 Overlap PCR 克隆获得 *gdrAB*（2178bp），如图 3A 所示，2500bp 附近有一条明显的条带，将该条带回收，并与 pACYCDuet-1 进行双酶切（*EcoR*I/*Hind*III）并酶连后转化 *E. coli* DH5α感受态细胞，通过菌落 PCR 验证确认，获得载体 pACYCDuet-*gdrAB*。利用同样方法，利用 PCR 克隆获得 *K. pneumoniae* 的甘油脱水酶基因 *dhaB*123（2679bp），如图 3B 所示，在 2700bp 左右获得清晰条带，回收后与 pACYCDuet-*gdrAB* 进行双酶切（*Nde*I/*Kpn*I）并酶连后构建获得 pACYCDuet-*gdrAB*-*dhaB*123。进一步克隆 *S. typhimurium* LT2 丙醛脱氢酶基因 *pduP*（1800bp 左右条带，如图 3C），在 pACYCDuet-*gdrAB*-*dhaB*123 基础上，获得 pACYCDuet-*gdrAB*-*dhaB*123-*pduP*，即 pACYCDuet-f0，重组质粒经过酶切验证（图 3E-1）和测序确认后用于后续实验。

分别提取质粒 puC57-*pct* 和 pET21a，进行双酶切（*Not*I/*Xho*I）后切胶回收获得 *pct* 基因片段和 pET21a 载体片段，酶连后转化 *E. coli* DH5α感受态细胞，通过菌落 PCR 确认获得重组载体 pET21a-*pct*。PCR 克隆 *Pseudomonas putida* 的 PHA 合成酶基因 *phaC*1 和 *phaC*2（1680bp，如图 3D），利用 *Nde*I 和 *BamH*I 对 *phaC*1、*phaC*2 及重组载体 pET21a-*pct* 进行双酶切，酶连后转化获得重组载体 pET21a-*phaC*1-*pct* 和 pET21a-*phaC*2-*pct*，即 pET21a-f1 和 pET21a-f2，重组质粒经过酶切验证（图 3E-2, 3E-3）和测序确认后用于后续实验。

将 pET21a-f1、pET21a-f2、pTV118N-pp 与 pACYCDuet-f0 分别组合并热激转化 *E. coli* JM109(DE3)感受态细胞，获得重组菌 *E. coli* JM109 (pACYCDuet-f0, pET21a-f1)、*E. coli* JM109 (pACYCDuet-f0, pET21a-f2) 和 *E. coli* JM109

(pACYCDuet-f0, pTV118N-pp)。

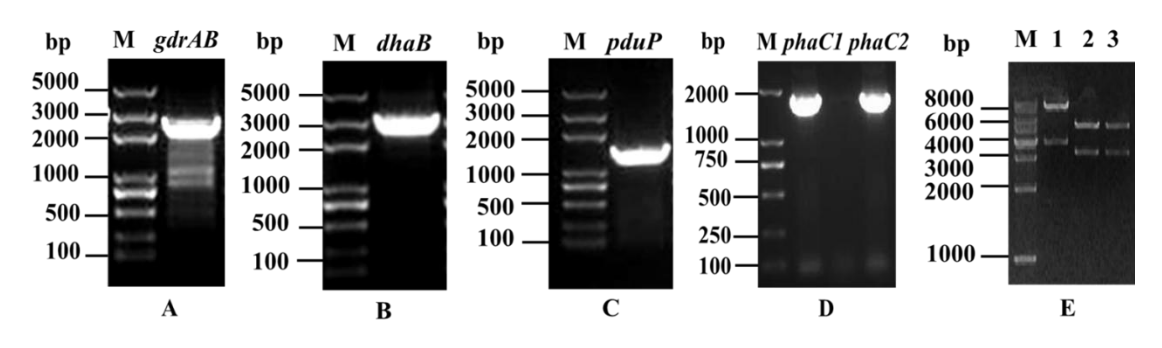


图 3 基因克隆及重组载体的酶切验证

Fig.3 PCR amplification of genes and restriction map of recombinant palsmids

(A) PCR amplification of *gdrAB*; (B) PCR amplification of *dhaB123*; (C) PCR amplification of *pduP*; (D) PCR amplification of *phaC1* and *phaC2*; (E) Restriction map of recombinant palsmids: 1- pACYCDuet-f0, 2- pET21a-f1, 3- pET21a-f2.

2.2 不同重组菌的产物合成鉴定

将获得的 3 株重组菌在相同的条件下进行培养，菌体浓度 OD_{600} 达到 0.6 左右时，加入 0.05mM 的 IPTG 进行诱导，发酵 48h 后收集菌体。利用热氯仿萃取产物，3 株重组菌均能获得疑似产物。疑似产物经 $CDCl_3$ 再次溶解后，通过核磁共振检测物质结构。检测结果发现，重组菌 *E. coli* JM109 (pACYCDuet-f0, pET21a-f1)和 *E. coli* JM109 (pACYCDuet-f0, pET21a-f2)的发酵产物为 P3HP（图 4A-B），在 ^{1}H 谱和 ^{13}C 谱上均未发现乳酸单体特异峰，未能实现 3HP 和乳酸的共聚。重组菌 *E. coli* JM109 (pACYCDuet-f0, pTV118N-pp)的产物检测结果如图 4C-D 所示。图 4C 为 ^{1}H 谱，在相应化学位移处，具有明显的 3HP 特征峰。对乳酸单体而言，其 1 位的甲基受临位氢的影响，裂解为二重峰（1.4ppm）；2 位的氢谱受到临位甲基的影响，裂解为四重峰（5.1ppm）。图 4D 为 ^{13}C 谱，在相应化学位移处发现了 3HP（32、59、171ppm）和乳酸（16.5、68.5、169ppm）的特征峰。核磁共振检测，证实了重组菌 *E. coli* JM109 (pACYCDuet-f0, pTV118N-pp)可以合成 P(3HP-co-LA)。

由于聚羟基脂肪酸合成酶 PhaC 的特异性较强[21, 22]，在利用 *Pseudomonas putida* 来源的原始 *phaC*1 和 *phaC*2 时，只是实现了 3HP 的聚合，获得的聚合物中没有发现乳酸单体（图 4A-B）。当把 PhaC1 的 325 和 481 位的氨基酸进行突变后（Ser325Thr 和 Gln481Lys），在聚合物中可以发现乳酸的聚合（图 4C-D），

获得了 P(3HP-co-LA)。需要注意的是，除了 3HP 和乳酸的特征峰外，还有其他峰的存在。导致该结果出现的原因，可能是经过位点突变后的 PhaC1（STQK）的特异性变弱，除了 3HP 和乳酸外还实现了其他物质的聚合。

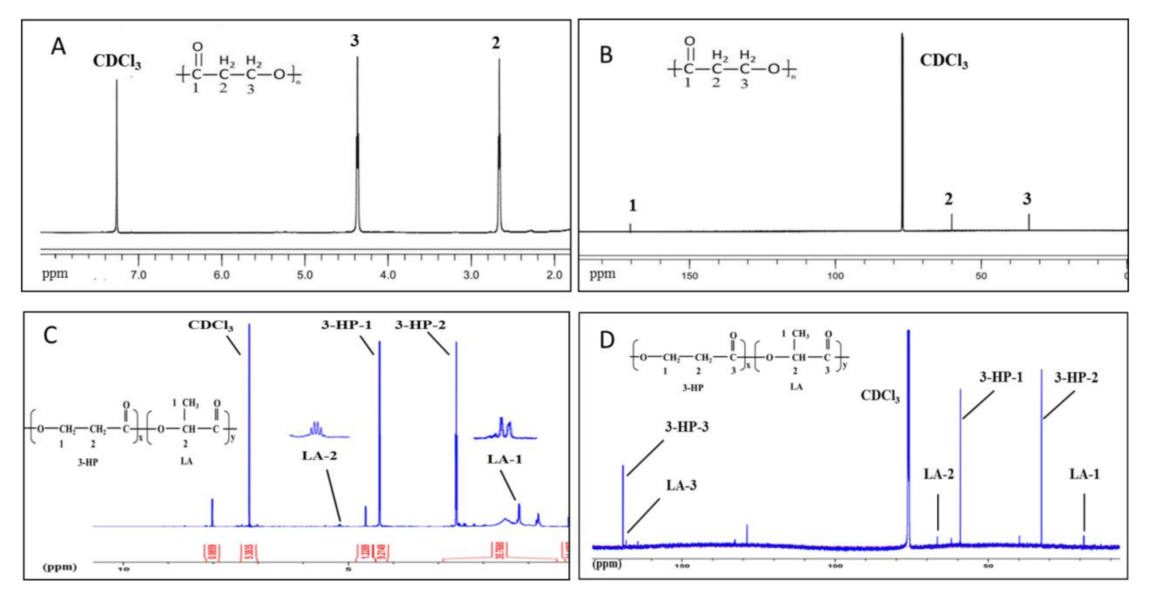


图 4 核磁共振检测结果

Fig.4 The 600 MHz ^{1}H (A, C) and ^{13}C (B, D) NMR spectra of PHA production in $CDCl_3$ solution.

2.3 溶氧对产物合成的影响

为了考察溶氧对 P(3HP-co-LA)合成的影响，分别采用挡板摇瓶和非挡板摇瓶，在 180 r/min 条件下对重组菌 *E. coli* JM109(DE3) (pACYCDuet-f0, pTV118N-pp)进行发酵。发酵 48h 后收集菌体，萃取产物，产量如图 5 所示。使用非挡板摇瓶时，产量只有 0.07g/L，占到细胞干重的 2.3% （wt/wt）；使用挡板摇瓶时，产量提高到 0.12g/L，找到细胞干重的 2.8%。挡板存在时，溶氧会明显提高，从而促进菌体的生长，细胞干重（Cell dry weight, CDW）由 3.1 g/L 提高到 4.3 g/L。在两种发酵条件下，产物占细胞干重比例没有明显变化，产物的提高主要是由细胞干重的变化引起的。

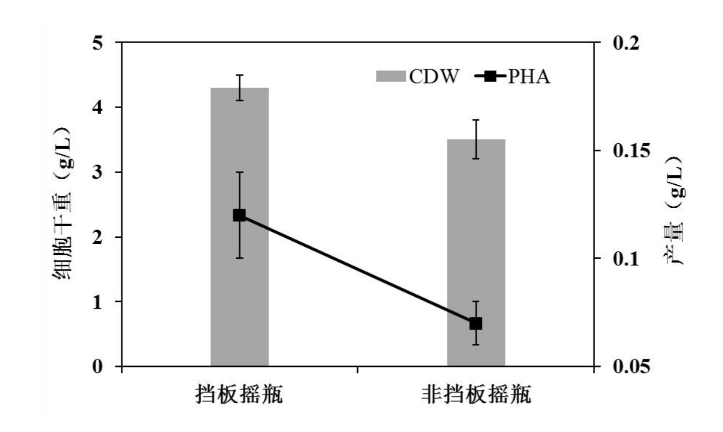


图 5 溶氧对细胞生长和产量的影响

Fig.5 Cell mass and production of P(3HP-co-LA) under different flask

2.4 有机氮源对产物合成的影响

为了研究有机氮源是否会对 P(3HP-co-LA)的合成产生影响，分别在培养基中添加 3 g/L 的大豆蛋白胨、胰蛋白胨、牛肉浸粉或酵母粉，在挡板摇瓶中进行发酵并考察不同氮源存在时的影响。发酵结束后的细胞干重和产物产量如图 6 所示。与对照实验相比（不含任何有机氮源），添加大豆蛋白胨和胰蛋白胨的时候，P(3HP-co-LA)的产量都受到了一定程度的抑制；使用牛肉浸粉时，菌体干重和 P(3HP-co-LA)产量没有明显变化。PHA 产品通常是在氮源缺乏的条件下容易在细胞内积累[2]，和本研究的以上结果一致。添加酵母粉时，P(3HP-co-LA)产量获得明显增强，达到了 0.22g/L，是对照实验的 1.83 倍，但是产物占细胞干重的比例只有 3.2%，表明产量的提高主要是细胞干重的增加引起的，酵母粉的使用并没有加强 P(3HP-co-LA)在单个细胞内的积累。

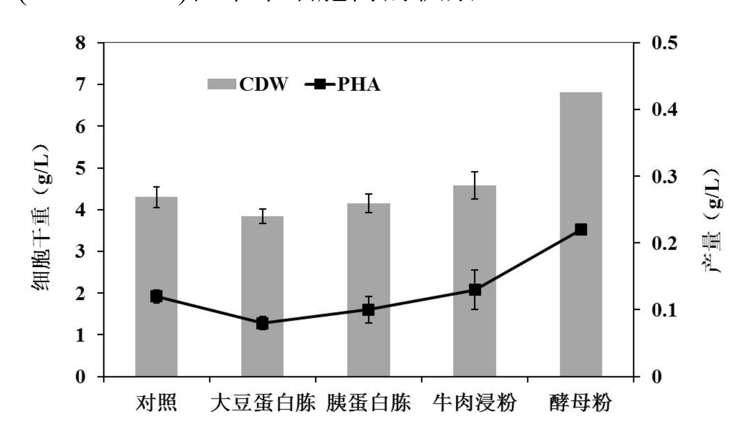


图 6 有机氮源对细胞生长和产量的影响

Fig.6 Cell mass and production of P(3HP-co-LA) under different organic nitrogen

3 结论

受聚羟基脂肪酸合成酶的特异性限制，乳酸的生物聚合一直难以实现，探讨乳酸的生物聚合方法具有重要意义。在聚 3-羟基丙酸合成途径基础上，通过过表达 *M. elsdenii* 的丙酰辅酶 A 转移酶 Pct 和 *P. putida* 来源的聚羟基脂肪酸合成酶 PhaC，成功构建了 3 株重组菌。原始的聚羟基脂肪酸合成酶 PhaC1 和 PhaC2 并不能实现乳酸单体的聚合，而双位点突变的聚羟基脂肪酸合成酶 PhaC1（STQK）成功实现了 3HP 和乳酸的共聚。通过条件优化，P(3HP-co-LA)产量达到了 0.22g/L，是对照实验的 1.83 倍，占细胞干重的 3.2%。本研究首次实现了 3HP 和乳酸的生物聚合，可以为含乳酸单体聚合物的生物合成提供重要参考。

参考文献

[1] Sudesh K, Abe H, Doi Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. Progress in Polymer Science, 2000, 25(10): 1503-55.

[2] Andesrson A J, Dawes E A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates . Microbiological reviews, 1990, 54(4): 450-72.

[3] Steinbüchel A. Perspectives for biotechnological production and utilization of biopolymers: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoate biosynthesis pathways as a successful example. Macromolecular Bioscience, 2001, 1(1): 1-24.

[4] Chen G Q, Wu Q, Xi J Z, et al. Microbial production of biopoly esters-polyhydroxyalkanoates. Progress in Natural Science, 2000, 10(11): 843-50.

[5] Lee S Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates. Biotechnology and Bioengineering, 1996, 49(1): 1-14.

[6] Lageveen R G, Huisman G W, Preusting H, et al. Formation of polyesters by Pseudomonas oleovorans: effect of substrates on formation and composition of poly-(R)-3-hydroxyalkanoates and poly-(R)-3-hydroxyalkenoates. Applied and environmental microbiology, 1988, 54(12): 2924-32.

[7] Shamala T R, Chandrashekar A, Vijayendra S, et al. Identification of polyhydroxyalkanoate (PHA)‐producing Bacillus spp. using the polymerase chain reaction (PCR). Journal of applied microbiology, 2003, 94(3): 369-74.

[8] Smith R L, West T P, Gibbons W R. Rhodospirillum rubrum: utilization of condensed corn solubles for poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production. Journal of applied microbiology, 2008, 104(5): 1488-94.

[9] Page W J, Manchak J, Rudy B. Formation of poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by Azotobacter vinelandii UWD. Applied and environmental microbiology, 1992, 58(9): 2866-73.

[10] Doi Y, Kawaguchi Y, Koyama N, et al. Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates in Alcaligenes eutrophus. FEMS Microbiology Letters, 1992, 103(2-4): 103-8.

[11] Matsumoto K I, Nagao R, Murata T, et al. Enhancement of Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Production in the Transgenic *Arabidopsis thaliana* by the in Vitro Evolved Highly Active Mutants of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Synthase from *Aeromonas caviae*. Biomacromolecules, 2005, 6(4): 2126-30.

[12] Somleva M N, Snell K D, Beaulieu J J, et al. Production of polyhydroxybutyrate in switchgrass, a value-added co-product in an important lignocellulosic biomass crop. Plant biotechnology journal, 2008, 6(7): 663-78.

[13] Lacmata S T, Kuiate J R, Ding Y, et al. Enhanced poly(3-hydroxypropionate) production via β-alanine pathway in recombinant *Escherichia coli*. PLoS ONE, 2017, 12(3): e0173150.

[14] Theodorou E C, Theodorou M C, Kyriakidis. Involvement of the AtoSCDAEB regulon in the high molecular weight poly-(R)-3-hydroxybutyrate biosynthesis in *phaCAB*$^{+}$ *Escherichia coli*. Metabolic Engineering, 2012, 14(4): 354-365.

[15] Shen X W, Yang Y, Jian J, et al. Production and characterization of homopolymer poly(3-hydroxyvalerate) (PHV) accumulated by wild type and recombinant *Aeromonas hydrophila* strain 4AK4. Bioresource Technology, 2009, 100(18): 4296-4299.

[16] 曹燕琳，尹静波，颜世峰．生物可降解聚乳酸的改性以及应用研究进展．高分子通报，2006, 10: 90-97.

[17] 甄光明．乳酸及聚乳酸的工业发展及市场前景．生物产业技术, 2015, 1: 42-52.

[18] Takase K, Taguchi S, Doi Y. Enhanced synthesis of poly(3-hydroxybutyrate) in recombinant Escherichia coli by means of error-prone PCR mutagenesis, saturation mutagenesis, and in vitro recombination of the type II polyhydroxyalkanoate synthase gene. Journal of Biochemistry, 2003, 133(1): 139–145.

[19] Brandl H, Gross R A, Lenz R W, et al. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(b-Hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. Applied and Environmental Microbiology, 1988, 54(8): 1977-1982.

[20] Feng X, Xian M, Liu W, et al. Biosynthesis of poly(3-hydroxypropionate) from glycerol

using engineered *Klebsiella pneumoniae* strain without vitamin B_{12}. Bioengineered, 2015, 6(2): 77-81.

[21] Bernd H A. Polyester synthases: Natural catalysts for plastics. Biochemical Journal, 2003, 376(1):15-33.

[22] Nomura C T, Taguchi S. PHA synthase engineering toward superbiocatalysts for custom-made biopolymers. Applied microbiology and biotechnology, 2007, 73:969-979.

Biosynthesis of Poly (3-hydroxypropionate-co-lactate) from Glycerol by Engineered *Escherichia coli*

ZHAO Zhi-qiang[1,2], Stephen T Lactama[1,3], XIAN Mo[1], LIU Xiu-tao[1,2], FENG Xin-jun[1], ZHAO Guang[1]

(1 CAS Key Laboratory of Biobased Materials, Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, China)

(2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

(3 Department of Biochemistry, University of Dschang, Dschang 999108, Cameroon)

Abstract Polyhydroxyalkanoates (PHAs) have received considerable attention because of their material properties and wide applications for packaging, biofuels, and biomedicine. Polylactate (PLA) is a representative bio-based polyester, which is chemically synthesized rather than synthesized by bacteria, because of the substrate specificity of PHA synthase (PhaC). To produce lactate-based polyesters, it is critical to obtain a PhaC capable of LA-polymerization. Glycerol dehydratase DhaB123 and its reactivating factor GdrAB from *Klebsiella pneumoniae*, and propionaldehyde dehydrogenase PduP from *Salmonella typhimurium* LT2 were overexpressed to convert glycerol into 3-hydroxypropionyl-CoA; propionyl-CoA transferase (PCT) from *Megasphaera elsdenii* DSM 20460 were used to obtain lactyl-CoA; and three different PhaC were introduced and examined for poly (3-hydroxypropionate-co-lactate) (P(3HP-co-LA)). The wild type enzyme PhaC1, PhaC2 from *Pseudomonas putida* can't polymerize lactyl-CoA into polymer. Only with double mutant (Ser325Thr and Gln481Lys) PhaC1(STQK), 3HP-CoA and lactyl-CoA were copolymerized into P(3HP-co-LA) in engineered *Escherichia coli*. Under optimal conditions,

the P(3HP-co-LA) production and content were 0.22 g/L and 3.2% (wt/wt [cell dry weight]), respectively. A good example was provided for lactate-based biopolymer by biosynthesis.

Key words Poly (3-hydroxypropionate-co-lactate); Polyhydroxyalkanoate Synthase; Propionyl-CoA transferase; Site mutation; Glycerol